四种松毛虫不同地理种群遗传多样性的等位酶分析

南宫自艳[1]，高宝嘉[1,*]，刘军侠[1]，杨　君[2]

(1 河北农业大学林学院，河北保定　071001；2 河北农业大学植保学院，河北保定　071001)

摘要：【目的】采用等位酶电泳技术对中国松毛虫属 *Dendrolimus* 4 种共 9 个地理种群进行遗传多样性和遗传分化研究。【方法】对 6 种等位酶系统乳酸脱氢酶(LDH)、苹果酸脱氢酶(MDH)、苹果酸酶(ME)、乙醇脱氢酶(ADH)、甲酸脱氢酶(FDH)、谷氨酸脱氢酶(GDH)进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。【结果】在 4 种松毛虫 9 个地理居群中共检测到 10 个基因位点，其中 4 个位点为多态位点，检测到 17 个等位基因；种群总体水平多态位点比率 $P=40\%$，平均有效基因数 $A=1.700$，平均期望杂合度 $He=0.151$，种群平均遗传距离为 0.001～0.285；其中马尾松毛虫指名亚种 *Dendrolimu punctatus* Walker 6 个居群的遗传分化度 $Fst=0.265$，基因流 $Nm=0.692$。4 种松毛虫之间遗传关系最近的是落叶松毛虫 *D. superans* Butler 和马尾松毛虫的地理亚种赤松毛虫 *D. punctatus spectabilis* Butler，遗传关系最远的是落叶松毛虫 *D. superans* Butler 和云南松毛虫 *D. houi* Lajonquiere。【结论】马尾松毛虫居群间遗传分化程度较大，基因交流较少，遗传漂变已经成为导致该物种种群分化的主要原因之一；遗传距离与地理距离存在一定相关性。

关键词：松毛虫属；地理种群；遗传多样性；等位酶；中国

中图分类号：Q963　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296(2008)04-0417-07

Genetic diversity of geographical populations of four *Dendrolimus* species (Lepidoptera：Lasiocampidae) in China based on allozyme analysis

NANGONG Zi-Yan[1]，GAO Bao-Jia[1,*]，LIU Jun-Xia[1]，YANG Jun[2] (1. College of Forestry，Agricultural University of Hebei，Baoding，Hebei 071001，China；2. College of Plant Protection，Agricultural University of Hebei，Baoding，Hebei 071001，China)

Abstract：【Aim】Using polyacrylamide gel electrophoresis to find out the genetic diversity among and within nine geographic populations of four *Dendrolimus* species in China：*Dendrolimus punctatus punctatus* Walker，*D. punctatus spectabilis* Butler，*D. superans* Butler，*D. haui* Lajonquiere and *D. kikuchii* Matsumura.【Methods】Six allozymes，including lactate dehydrogenase (LDH)，malate dehydrogenase (MDH)，malic enzyme (ME)，alcohol dehydrogenase (ADH)，formic acid dehydrogenase (FDH) and glutamate dehydrogenase (GDH)，were analyzed.【Results】Ten loci and seventeen alleles were recorded with four loci polymorphic，$P=40.0\%$. The average number of alleles per locus A was 1.700，the expected heterozygosity He 0.151，and the mean genetic distance 0.001－0.285. Among six populations of *D. punctatus* Walker，the coefficient of gene differentiation Fst was 0.265，and the number of migrants per generation Nm 0.692. Genetic relationships among populations and species were assessed by standard genetic distance，and it was found that *D. punctatus spectabilis* Butler and *D. superans* Butler had a closer relationship，while *D. superans* Butler and *D. haui* Lajonquiere had the farthest relationship.【Conclusions】According to the heredity parameters，gene flow was low and genetic drift was one of primary factors that led to the genetic differentiation among six geographic populations of *D. punctatus* Walker. Genetic distances were correlated with geographical distances among populations.

Key words：*Dendrolimus*；geographical populations；genetic diversity；allozyme；China

---

基金项目：国家自然科学基金项目(30771739)

作者简介：南宫自艳，女，1976 生，博士研究生，主要从事森林昆虫分子生态学研究，Tel.：0312-7528900；E-mail：ngzyheb@yahoo.com.cn

* **通讯作者** Author for correspondence，Tel.：0312-7521492；E-mail：baojiagao@163.com

收稿日期 Received：2007-08-03；**接受日期** Accepted：2008-01-11

在我国，林业上最严重的害虫当属鳞翅目枯叶蛾科松毛虫属 *Dendrolimus* 昆虫，其中以马尾松毛虫指名亚种 *Dendrolimu punctatus punctatus* Walker、赤松毛虫 *D. punctatus spectabilis* Butler、落叶松毛虫 *D. superans* Butler、云南松毛虫 *D. houi* Lajonquiere、思茅松毛虫 *D. kikuchii* Matsumura 为典型代表，给林业生产造成重大的经济损失。赵青山等(1992，1999)利用杂交实验方法证实赤松毛虫和油松毛虫分别与马尾松毛虫可以产生可育的杂交后代，二者应是马尾松毛虫的地理亚种。目前，我国在松毛虫发生地区大多采用阿维菌素、苦参碱乳油及白僵菌等生物防治结合化学防治控制其危害，均大大降低了当年越冬代老熟幼虫的基数，从而减轻来年松毛虫危害。同时，自然生境中多种寄生蜂、寄生蝇以及雨水冲刷也起到很大的生态控制作用。但在某些重灾区仍然存在年年防治年年发生、特殊年份爆发成灾的情况。可见，复杂的生境、不同种混合发生及天然杂交种的杂种优势使得松毛虫已产生出一系列适应外界生态条件的遗传策略，其自身遗传力的变异与自然环境相互作用逐渐形成不同的地理亚种或不同的生态型，显示出种间及种下的遗传分化。这种遗传变异仅用常规的形态学、杂交实验等方法已经不足以有效地验证说明，因此，许多研究者开始利用分子遗传标记技术来分析松毛虫的种群遗传多样性(张爱兵等，2004；Ji *et al*.，2005)，以此来为生产实践提供理论指导。

在众多分子遗传标记技术中，等位酶技术是目前应用于物种遗传多样性研究的经典方法之一。等位酶作为同一位点上不同等位基因编码的同一种酶的不同形式，能够很好地表明等位基因位点的变化，从而了解物种居群内、居群间的遗传分化、基因流、遗传漂变及居群遗传变异的时空动态等，已经广泛应用于多种昆虫的种群遗传结构研究中(Martel *et al*.，2003；Van Oosterhout *et al*.，2004；Jane *et al*.，2006)。本实验以我国松毛虫属 4 种松毛虫(马尾松毛虫、落叶松毛虫、云南松毛虫、思茅松毛虫，其中 6 个马尾松毛虫居群中包括 3 个赤松毛虫地理亚种居群)为研究对象，初步探讨 4 种松毛虫共 9 个地理种群的遗传多样性，为松毛虫地理种群遗传结构的研究补充提供生化资料和依据，也为不同种松毛虫自然种群的联防联治提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料采集

马尾松毛虫 6 个居群采自辽宁沈阳和锦州，湖南会同和通道，山东青岛及江西余江；落叶松毛虫居群采自河北张家口；云南松毛虫采自四川广元；思茅松毛虫采自重庆梁平。均为在采集地随机采集虫蛹，室内成虫羽化后立即放入 －20℃低温保存。

表 1 9 个松毛虫居群的材料来源

Table 1 Origin of nine geographical populations of *Dendrolimus* spp.

种类 Species	采集地点 Location	种群代号 Population code	纬度和经度 Latitude and longitude
马尾松毛虫指名亚种	湖南会同 Huitong，Hunan	HTM	26° 40′N，109°26′E
D. punctatus punctatus (Walker)	湖南通道 Tongdao，Hunan	TDM	26° 07′N，109°46′E
	江西余江 Yujiang，Jiangxi	YJM	28° 11′N，116°54′E
赤松毛虫 *D. punctatus spectabilis* (Butler)	辽宁沈阳 Shenyang，Liaoning	SYC	41° 11′ N，119°23′ E
	辽宁锦州 Jinzhou，Liaoning	JZC	40° 27′ N，119°51′ E
	山东青岛 Qingdao，Shandong	QDC	41° 07′N，121°05′E
落叶松毛虫 *D. superans* (Butler)	河北张家口 Zhangjiakou，Hebei	ZJKL	40° 50′N，114°53′E
云南松毛虫 *D. houi* (Lajonquiere)	四川广元 Guangyuan，Sichuan	GYYN	31° 53′N，105°16′E
思茅松毛虫 *D. kikuchii* (Matsumura)	重庆梁平 Liangping，Chongqing	LPS	30° 25′N，107°24′E

1.2 等位酶电泳

样品处理：各种群分别选取 15 头雄虫，将每头雄虫的胸部切下，加入预冷的提取液 600 μL (H_2O 30 mL；Tris 0.048 g；巯基乙醇 30 μL；蔗糖 3.3 g；pH = 7.0)在冰浴条件下匀浆，4℃离心 10 min (8 000 r/min)，取上清液分装后保存于冰箱(－20℃)中备用。电泳及染色：制备聚丙烯酰胺线性梯度凝胶进行等位酶电泳，分离胶浓度为 7.5% (pH = 8.8)，浓缩胶浓度为 5% (pH = 6.8)。电极缓冲液为 Tris-甘氨酸 (pH = 8.3)。每个样品上样 10 μL，加适量溴酚蓝，4℃条件下电泳，电泳完成后分别进行各种等位酶的染色。等位酶的染色参考了王中仁(1998)的基本方法。

实验共进行 9 种等位酶电泳：酯酶 (esterase，EST，E.C.3.1.1.－)、超氧化物歧化酶 (superroxide dismutase，SOD，E.C.1.15.1.1)、淀粉酶(amylas，AMY，

E.C.3.2.1.1)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase，LDH，E.C.1.1.1.27)、苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase，MDH，E.C.1.1.1.37)、苹果酸酶(malice enzyme，ME，E.C.1.1.1.40)、乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase，ADH，E.C.1.1.1.1)、甲酸脱氢酶(formate dehydrogenase，FDH，E.C.1.2.1.2)、谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenas，GDH，E.C.1.4.1.2)，经电泳条件优化从中筛选出图谱清晰、结果稳定的 6 种等位酶：LDH，MDH，ME，ADH，FDH 和 GDH。

1.3　结果记录及遗传参数分析

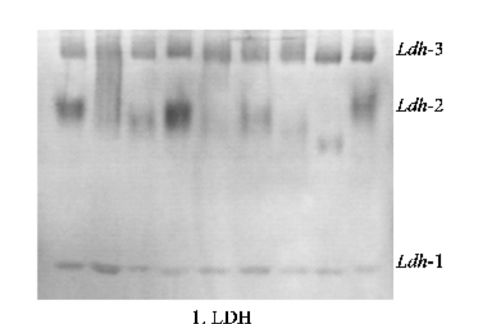
按王中仁(1998)提供的酶谱分析方法对所测等位酶系统的酶谱及基因型进行判读。数据处理和聚类运算应用 POPGENE-Version1.31 软件(Yeh *et al*.，1999)，获得各位点的等位基因频率，并计算以下遗传参数：多态位点百分数(P)；平均每个位点的有效等位基因数(Ae)；平均每个位点的观测杂合度(Ho)和预期杂合度(He)；Shannon 信息指数(I)，多态位点固定指数 F 值；计算遗传一致度(I)和遗传距离(D)，并根据遗传距离用算术平均的不加权对群法(UPGMA)构建系统树。在马尾松毛虫居群内计算：杂合性基因多样度比率(Fst)；居群每代迁移数(Nm)，基因流的测定由公式 $Nm = 0.25(1 - Fst)/Fst$ 算得。

2　结果与分析

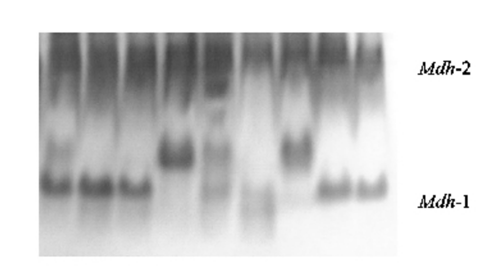
2.1　4 种松毛虫 9 个居群的等位酶带型及遗传学分析

共进行 9 种等位酶电泳(EST，SOD，AMY，LDH，MDH，ME，ADH，FDH 和 GDH)，从中筛选出图谱清晰、结果稳定的 6 种等位酶：LDH，MDH，ME，ADH，FDH 和 GDH。各等位酶电泳图谱见图 1 (泳道从左至右依次为 SYC，JZC，QDC，HTM，TDM，YJM，ZJKL，GYYN 和 LPS 居群)。根据酶带在 4 种松毛虫 9 个居群中的分布，并参考鳞翅目其他昆虫等位酶的相关文献，最终确定检测到 10 个基因位点：*Ldh*-1，*Ldh*-2，*Ldh*-3，*Me*-1，*Me*-2，*Mdh*-1，*Mdh*-2，*Adh*-1，*Fdh*-1 和 *Gdh*-1。其中 4 个位点为多态位点：*Ldh*-2，*Me*-1，*Mdh*-1 和 *Gdh*-1。对 10 个基因位点进行遗传学分析，共检到 17 个等位基因，其中 *Ldh*-2 含 4 个等位基因，*Me*-1 含 3 个等位基因，均属于复等位基因，*Mdh*-1，*Gdh*-1 含 2 个等位基因，其余单态位点各含一个等位基因。

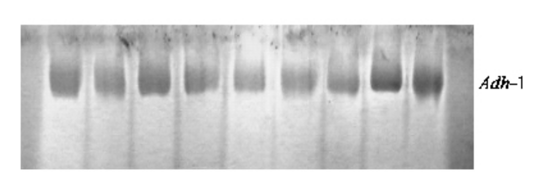
2.2　4 种松毛虫 9 个居群的等位基因频率



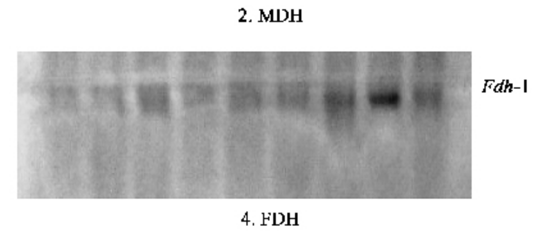
1. LDH



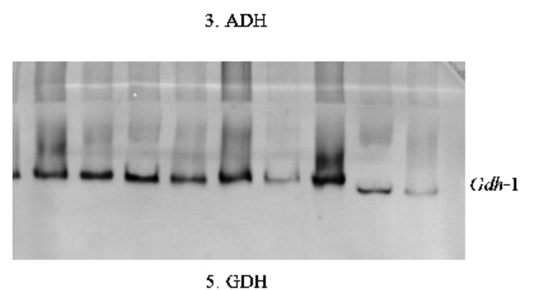
2. MDH



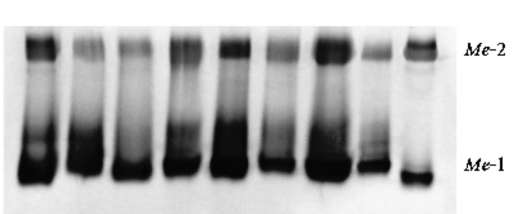
3. ADH



4. FDH



5. GDH



6. ME

图 1　LDH，MDH，ME，ADH，FDH 和 GDH 的带型

Fig. 1　Electrophoretic forms of LDH，MDH，ME，ADH，FDH and GDH

松毛虫属 4 种松毛虫 9 个居群的基因频率分布情况见表 2。在检测到的 17 个等位基因中，其中 SYC，JZC，YJM 和 GYYN 居群检测到的等位基因数最多(均为 13 个等位基因)，等位基因数最少的群体为 QDC 和 ZJKL 居群(均为 11 个等位基因)。根据各位点的等位基因频率分布特点可将等位基因分为以下几类：第 1 大类全域基因包括 9 个基因，在所有居群中均出现，即 *Me*-1b，*Me*-2，*Mdh*-1a，*Mdh*-1b，*Mdh*-2，*Ldh*-1，*Ldh*-3，*Adh*-1 和 *Fdh*-1，占总基因数的 52.94%；第 2 大类包括 *Ldh*-2b，*Ldh*-2c，*Gdh*-1b，*Me*-1a 4 个基因，它们分布于 30% 以上的居群中，占总基因数的 23.53%，并且 *Ldh*-2b，*Ldh*-2c，*Gdh*-1b 3 个基因在马尾松毛虫 6 个居群中普遍存在；第 3 大类包括 3 个基因，占总基因数的 17.65%，其中 *Me*-1c 仅分布在 YJM 和 GYYN 居群，*Ldh*-2a 仅分布在 JZC 和 GYYN 居群，*Gdh*-1a 仅分布在 GYYN 和 LPS 居群，可见 3 个基因在 GYYN 居群中均有分布；第 4 大类为 LPS 居群特有的基因 *Ldh*-2d，为总基因数的 5.88%。其中，*Mdh*-1b 在 QDC，YJM 和 GYYN 居群中等位基因频率均小于或等于 0.05，所以该基因在这 3 个居群中均为稀有基因。数据显示各居群不同类型基因数目不同，而且，相同位点的等位基因频率在居群间也存在差异，在一定程度上反应了各居群的等位基因存在差异。

表 2 9 个松毛虫居群等位基因频率

Table 2 Alleles frequency of nine geographical populations of *Dendrolimus* spp.

基因座 Locus	种群 Population								
	SYC	JZC	QDC	HTM	TDM	YJM	ZJKL	GYYN	LPS
Me-1a	0.154	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.154	0.250
Me-1b	0.846	1.000	1.000	1.000	1.000	0.900	1.000	0.769	0.750
Me-1c	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.100	0.000	0.077	0.000
Me-2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Mdh-1a	0.923	0.792	0.950	0.538	0.833	0.950	0.385	0.962	0.917
Mdh-1b	0.077	0.208	0.050	0.462	1.167	0.050	0.615	0.038	0.083
Mdh-2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Ldh-1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Ldh-2a	0.000	0.083	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000
Ldh-2b	0.769	0.667	1.000	0.308	0.250	0.200	1.000	0.000	0.000
Ldh-2c	0.231	0.250	0.000	0.692	0.750	0.800	0.000	0.000	0.000
Ldh-2d	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
Ldh-3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Adh-1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Fdh-1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Gdh-1a	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000
Gdh-1b	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000
等位基因数 Number of alleles	13	13	11	12	12	13	11	13	12

2.3 4 种松毛虫 9 个居群的遗传多样性

每个遗传位点的平均等位基因数(A)、平均有效等位基因数(Ae)、Shannon 信息指数(I)、多态位点百分率(P)、平均观测杂和度(Ho)、平均期望杂和度(He)、多态位点固定指数 F-值都是反映群体遗传多样性的基础指标。松毛虫各居群遗传多样性参数指标见表 3。由表 3 可知，9 个松毛虫居群平均多态位点比率 P 为 20.0% (变幅为 10.0% ~ 30.0%)，A 为 1.222(变幅为 1.100 ~ 1.300)，He 为 0.061(变幅为 0.010 ~ 0.096)；居群总体水平 P = 40.0%，A = 1.700，He = 0.151；居群遗传多样性总体水平均高于居群平均水平。固定指数 F 可以用来判断群体中实际杂合体比率与理论期望杂合体比率的偏离程度及其原因，从而衡量群体基因型的实际频率是否偏离 Hardy-Weinberg 平衡。根据表 3 中各居群 F 值分析可知：SYC，JZC，YJM，GYYN，LPS，HTM 和 TDM

表 3 9 个松毛虫居群遗传多样性参数

Table 3 Genetic diversity parameters of nine geographical populations of *Dendrolimus* spp.

种群 Population	A	Ae	I^*	Ho	He	P	F
SYC	1.300	1.107	0.124	0.015	0.079	30.0	0.810
JZC	1.300	1.144	0.134	0.008	0.085	20.0	0.906
QDC	1.100	1.010	0.020	0.010	0.010	10.0	0.000
HTM	1.200	1.173	0.131	0.000	0.096	20.0	1.000
TDM	1.200	1.099	0.101	0.000	0.068	20.0	1.000
YJM	1.300	1.080	0.102	0.010	0.063	30.0	0.841
ZJKL	1.100	1.090	0.067	0.077	0.049	10.0	−0.571
GYYN	1.300	1.069	0.085	0.008	0.047	20.0	0.830
LPS	1.200	1.078	0.085	0.017	0.055	20.0	0.691
居群平均水平 At population level	1.222	1.094	0.094	0.016	0.061	20.0	0.612
总体水平 At species level	1.700	1.324	0.260	0.017	0.151	40.0	0.887

A：平均每位点等位基因数目 Number of alleles per locus；Ae：平均每位点等位基因有效数目 Effective number of alleles per locus；I：Shannon 信息指数 Shannon information index；Ho：平均每位点观测杂合度 Observed heterozygosity；He：平均每位点期望杂合度 Expected heterozygosity；P：多态点比率 Percentage of polyporphic loci；F：固定指数 Fixation index.

居群的 F 值均为正值，说明各居群内部纯合体过量；ZJKL 居群 F 值为负值，说明居群内部杂合体过量；QDC 居群 F 值为零，说明该居群内部为随机交配，实际等位基因频率符合 Hardy-Weinberg 平衡。

2.4　马尾松毛虫种内居群的遗传分化水平

在种群遗传多样性研究中，常用 Wright 的 F 统计量来描述群体的基因分化程度，可检测群体中基因型实际比率与 Hardy-Weinberg 理论期望比例的偏离程度，也可以度量群体间的分化程度。6 个马尾松毛虫居群多态位点的 F 统计量分解值和 Nm 值见表 4。其中 Fis 表示在亚居群内基因型的实际频率和理论预期频率的离差；Fit 表示总居群中基因型的实际频率和理论预期频率的离差；Fst 表示随机取自每个亚居群两个配子的相互关系，用来测量亚居群间的遗传分化程度（王中仁，1998）。马尾松毛虫各居群间杂合性基因多样度比率 Fst 的平均值为 0.265，说明总遗传多样性的 26.5% 来自于居群间的遗传变异，居群间的遗传分化已经达到较高的水平；居群每代迁移数 Nm 的平均值为 0.692，说明马尾松毛虫各居群间基因交流较小。

表 4　6 个马尾松毛虫居群在多态位点上的等位基因 F-统计及基因流

Table 4　Summary of F-statistics at polymorphic loci of six geographical populations of *D. punctatus* Walker

位点 Loci	*Fis*	*Fit*	*Fst*	*Nm*
Me-1	1.000	1.000	0.104	2.160
Mdh-1	0.696	0.741	0.147	1.449
Ldh-2	1.000	1.000	0.359	0.446
Mean	0.883	0.914	0.265	0.692

2.5　4 种松毛虫 9 个居群的遗传距离及聚类分析

9 个松毛虫居群间的 Nei 遗传距离和遗传一致度如表 5 所示。供试材料的遗传一致度从 0.752 ~ 0.999，遗传距离从 0.001 ~ 0.285，遗传变异较大。根据遗传距离可知：在马尾松毛虫居群间遗传关系最近的是 TDM 居群与 YJM 居群（D = 0.001），遗传关系最远的是 QDC 居群与 HTM 居群（D = 0.069）；在 4 种松毛虫种间遗传关系最近的是 JZC 居群与 ZJKL 居群（D = 0.026），遗传关系最远的是 ZJKL 居群与 GYYN 居群（D = 0.285）。从居群分布的地理区域看，随着东北、华北与长江流域和西南的地理距离渐远，各居群的遗传距离也呈逐渐增大的趋势，反映出遗传距离和地理距离存在一定的相关性。

根据遗传距离用算术平均的不加权对群法（UPGMA）构建 9 个松毛虫居群的系统树，结果见图 2。可以看出松毛虫 9 个居群大致可以分为两支：其中马尾松毛虫地理亚种赤松毛虫的沈阳、锦州、青岛 3 个居群首先聚在一起，然后与张家口落叶松毛虫居群相聚形成第一亚类；然后与会同、通道、余江 3 个马尾松毛虫居群构成的第二亚类构成第一大类；由云南松毛虫和思茅松毛虫居群聚成第二大类。遗传距离数据和聚类结果较符合松毛虫属昆虫的地理分布规律，其中赤松毛虫居群与落叶松毛虫

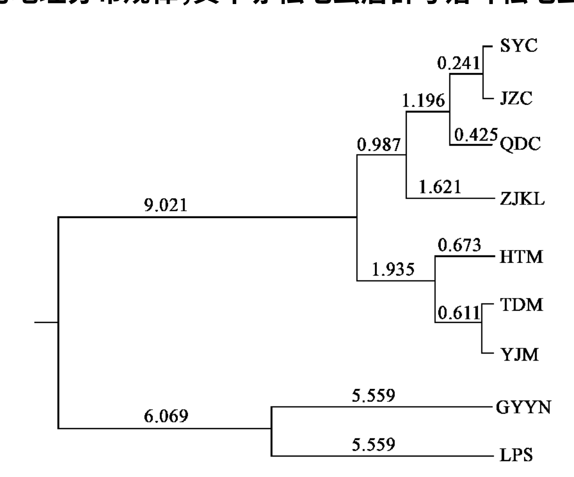


图 2　松毛虫居群聚类图

Fig. 2　UPGMA dendrograms based on Nei's genetic distance of *Dendrolimus* spp.

表 5　9 个松毛虫居群间遗传相似性及遗传距离

Table 5　Nei's genetic identity and genetic distance of nine geographical populations of *Dendrolimus* spp.

种群 Population	SYC	JZC	QDC	HTM	TDM	YJM	ZJKL	GYYN	LPS
SYC	–	0.996	0.993	0.960	0.959	0.965	0.962	0.806	0.805
JZC	0.004	–	0.990	0.978	0.978	0.970	0.974	0.815	0.805
QDC	0.007	0.010	–	0.934	0.941	0.934	0.968	0.791	0.788
HTM	0.041	0.024	0.069	–	0.992	0.981	0.948	0.786	0.787
TDM	0.042	0.022	0.060	0.008	–	0.999	0.920	0.803	0.801
YJM	0.031	0.031	0.068	0.019	0.001	–	0.899	0.805	0.801
ZJKL	0.036	0.026	0.033	0.054	0.083	0.107	–	0.752	0.754
GYYN	0.215	0.204	0.235	0.241	0.219	0.217	0.285	–	0.895
LPS	0.216	0.217	0.239	0.240	0.223	0.223	0.283	0.111	–

对角线以下为 Nei 的遗传距离，对角线以上为遗传一致度。Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal).

居群均采自我国北部地区；而3个马尾松毛虫居群来自于我国湖南和江西；云南松毛虫和思茅松毛虫居群则来源于我国四川和重庆。

3 讨论

等位酶标记是在蛋白质水平上分析特定的位点、等位基因和基因型，具有共显性标记、操作简单、等位酶种类繁多等诸多优点，可以从分子水平上揭示种群遗传变异的机制。但是在等位酶实验中应注意试材选取的一致性，在本文前期实验中发现松毛虫的雌雄虫体所做出的等位酶图谱是不同的，分析结果也有所不同。若使用雌虫提取酶液，雌虫胸部和腹部提取结果也不相同；但雄虫胸部和腹部提取结果一致。有文献表明在昆虫不同的器官或不同的发育阶段，等位酶表达的种类及含量是不尽相同的(Fisk and Daly, 1989；郭晓霞和郑哲民，2002)。因此推测是雌虫腹部的卵粒中含有特定表达的酶类，从而导致酶谱分析出现较大差异，该推论还有待于进一步研究。所以，为了避免因提取材料不统一而导致结果的不准确性，本文在提取酶液时一致使用松毛虫雄虫胸部肌肉。文中只选用了6种等位酶(LDH, MDH, ADH, FDH, ME 和 GDH)进行了遗传学分析，在今后的工作中应该继续优化等位酶体系，并同时采用多种等位酶进行电泳，以期达到更加准确的遗传学分析。

本文在根据固定指数 F 值衡量4种松毛虫9个居群的基因型实际频率是否偏离 Hardy-Weinberg 平衡时，发现只有 QDC 居群等位基因频率符合 Hardy-Weinberg 平衡，而其他8个居群等位基因频率均在一定程度上偏离 H-W 平衡。显著偏离 H-W 平衡的原因是多方面的，例如居群不是随机交配或是基因成分发生变化，并且除了受遗传学规律的控制外还有可能是受外界环境因素的影响。松毛虫居群是否偏离 H-W 平衡，推测原因应该与各居群的生存环境、种群规模及寄主有关。QDC 居群采自青岛胶南市琅玡镇，三面环水，与其他地区松毛虫居群的基因交流存在明显障碍；其次，其他两个赤松毛虫居群的寄主为赤松和油松，而青岛赤松毛虫的寄主为黑松。单一的寄主食物及特殊的环境条件可能导致其成为一个随机交配的居群，等位基因得以稳定遗传。赤松毛虫沈阳和锦州居群、马尾松毛虫居群、云南松毛虫居群、思茅松毛虫居群固定指数 F 为正值，各居群采集样地均为开放的山坡林地且均为单一种类发生，居群规模都较小，推测居群在这种自然条件下存在近交交配的繁育方式，在遗传过程中增加纯合性，导致杂合体不足，从而打破 H-W 平衡。张家口落叶松毛虫居群的固定指数 F 为负值，居群样地生境复杂，林型为华北落叶松、黑松、油松混交林，食料充足，温度适宜，适宜松毛虫繁殖，居群规模也较大，在落叶松毛虫取食不同寄主的过程中使得这一地区的松毛虫频繁地暴露于各种生境中，显示出过量的杂合体。

本研究中马尾松毛虫6个居群平均水平 Fst = 0.265, Nm = 0.692，可知居群间分化水平已达到较高水平，基因交流较低。与粘虫(郝纪华等，1992)、棉铃虫(Nibouche *et al.*, 1998；徐广等，2000；Han and Caprio, 2002)、小菜蛾(Pichon *et al.*, 2006)、濒危蛱蝶 *Boloria aquilonari* (Vandewoestijine and Baguette, 2002)等鳞翅目其他昆虫相比较，马尾松毛虫居群间分化水平均高于以上报道的昆虫种群遗传结构的等位酶结果。Slatkin(1985, 1987)认为群体间基因流可以用群体每代迁移系数(Nm)来度量，如 $Nm > 1$ 表明较大程度的基因交流可以使各基因在居群间广泛分布，在一定程度上削弱遗传漂变的作用，防止种群分化的发生；若 $Nm < 1$ 则表明居群间基因交流较少，无法有效抵消遗传漂变所引起的种群分化，遗传漂变就成为刻划群体遗传结构的主要因素。6个马尾松毛虫群体的基因流 Nm 仅为0.692，推测其原因应该是人为干扰(如化学防除、林地放牧等)和环境恶化造成马尾松毛虫生栖地片断化，继而片断化的生境加大居群间的隔离程度，进而阻碍居群间的基因交流；松毛虫成虫无迁飞习性，飞翔力不高，也应该是其基因交流水平低的原因之一。生境分散、规模较小的居群较易导致居群结构发生遗传漂变，低水平的基因交流又无法削弱遗传漂变的影响(Slatkin, 1985)，由此可见，可能会因遗传漂变作用进一步加大马尾松毛虫居群间的遗传结构分化程度。

赵清山等(1992, 1999)研究已经证实赤松毛虫和油松毛虫是马尾松毛虫的地理亚种；张爱兵等(2004)利用 RAPD 指纹图谱技术也证明油松毛虫和赤松毛虫与马尾松毛虫的亲缘关系很近。本文4种松毛虫9个居群的遗传距离数据和树状聚类图同样支持以上研究结论。随着东北、华北与长江流域、西南的地理距离渐远，松毛虫各居群的遗传距离也大体呈逐渐增大的趋势，所以初步推断地理距离和遗传距离存在一定的相关性。同时，从聚类图上也可以看出松毛虫遗传关系与地理分布有相关性：分布

在我国华北、东北的赤松毛虫居群和落叶松毛虫居群首先聚在一起，然后与聚在一起的 3 个南方马尾松毛虫居群相聚，而来自于四川盆地的思茅松毛虫和云南松毛虫居群相聚后单独形成一支。高立杰(2007)研究发现赤松毛虫居群遗传多样性与生境的年均温度、年均湿度、海拔高度存在明显的相关性，初步证实地理隔离对基因交流存在一定的阻碍作用。松毛虫属昆虫在食料充足的情况下，不作远距离的迁飞(侯陶谦，1987)，这种生物学特性利于居群间的隔离，再加上不同分布区地理气候的显著差异形成稳定的空间隔离，也大大减少了各居群之间的基因交流，从而遗传变异得以稳定遗传，形成不同的地理亚种和种间的分化。

不同种松毛虫的混合发生以及天然杂交种的杂种优势是松毛虫危害严重和难以根除的重要原因(赵清山，1999)，所以探明松毛虫属昆虫亲缘关系的远近及不同地理种群的遗传多样性，对于多种松毛虫的综合防治有重要意义。本论文从等位酶的角度初步探讨在我国发生最为严重的 4 种松毛虫的遗传多样性，对前人的研究结论进行了佐证和补充，在今后的工作中还应该选择更多种等位酶进行分析，并就遗传变异与生态因子相关性进行深入研究，从而完成更充分、更精确的解释，为研究昆虫分子遗传进化提供更有价值的理论参考。

参 考 文 献 (References)

Fisk JH，Daly JC，1989. Electrophoresis of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *H. punctigera* (Wallengren) (Lepidoptera：Noctuidae)：genotype expression in eggs and allozyme variations between life stages. *Australian Entomological Society*，28：191 – 192.

Guo XX，Zheng ZM，2002. Studies on esterase isoenzyme of *Pieris rapae* at different developmental stages. *Acta Entomologica Sinica*，45(3)：401 – 403. [郭晓霞，郑哲民，2002. 菜粉蝶不同发育期酯酶同工酶的比较研究. 昆虫学报，45 (3)：401 – 403]

Gao LJ，2007. Genetic Diversity in *Dendrolimus* (Lepidoptera) Geographical Populations and Its Relationship with Ecological Factors. MS Thesis，Agricultural University of Hebei. 26 – 27. [高立杰，2007. 松毛虫地理种群遗传多样性及其与生态因子的相关性研究. 河北农业大学硕士论文. 26 – 27]

Hao JH，Li SW，Lin CS，1992. Isozyme cariation in defferent local populations of *Mythimna separate*. *Acta Entomologica Sinica*，35 (1)：33 – 39. [郝纪华，李绍文，林昌善，1992. 不同地区粘虫群体的同功酶变异. 昆虫学报，35 (1)：33 – 39]

Han Q，Caprio MA，2002. Temporal and spatial patterns of allelic frequencies in cotton bollworm (Lepidoptera：Noctuidae). *Environmental Entomology*，31(3)：462 – 468.

Hou TQ，1987. Pine Caterpillars in China. Scientific Press，Beijing. 29 – 78. [侯陶谦，1987. 中国松毛虫. 北京：科学出版社. 29 – 78.]

Jane KH，Clare LH，Calvin D，Jeremy BS，2006. Genetic diversity in butterflies：interactive effects of habitat fragmentation and climate-driven range expansion. *Biology Letter*，2：152 – 154.

Ji YJ，Hua YP，Liu YD，Liu HT，Shi CM，Li DM，Zhang DX，2005. Ten polymorphic microsatellite markers developed in the masson pine moth *Dendrolimus punctatus* Walker (Lepidoptera：Lasiocampidae). *Molecular Ecology Notes*，5：911 – 913.

Martel C，Re jasse A，Rousset F，Bethenod MT，Bourguet D，2003. Host-plant-associated genetic differentiation in Northern French populations of the European corn borer. *Heredity*，90：141 – 149.

Nibouche S，Bues R，Toubon J，Poitout S，1998. Allozyme polymorphism in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera：Noctuidae)：comparison of African and European populations. *Heredity*，80：438 – 445.

Pichon A，Arvanitakis L，Roux O，Kirk AA，Alauzet C，Bordat D，Legal L，2006. Genetic differentiation among various populations of the diamondback moth，*Plutella xylostella* (Lepidoptera：Yponomeutidae). *Bull. Entomol. Res.*，96(2)：137 – 144.

Slatkin M，1985. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution*，39(1)：53 – 65.

Slatkin M，1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*，236：787 – 792.

van Oosterhout C，van Heuven MK，Brakefield PM，2004. On the neutrality of molecular genetic markers：pedigree analysis of genetic variation in fragmented populations. *Molecular Ecology*，13(5)：1 025 – 1 034.

Vandewoestijine S，Baguette M，2002. The genetic structure of endangered populations in the Cranberry Fritillary，*Boloria aquilonaris* (Lepidoptera，Nymphalidae)：RAPDs vs allozymes. *Heredity*，89：439 – 445.

Wang ZR，1998. Allozyme Analysis in Studies of Plant. Scientific Press，Beijing. [王中仁，1998. 植物等位酶分析. 北京：科学出版社]

Xu G，Guo YY，Wu KM，2000. Allozyme variation within and among five geographic populations of *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Acta Entomologica Sinica*，43 (Suppl.)：64 – 69. [徐广，郭予元，吴孔明，2000. 棉铃虫地理种群的等位酶变异. 昆虫学报，43 (增刊)：64 – 69]

Yeh FC，Yang RC，Boyle T，1999. POPGENE Version 1.31 – Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. University of Alberta and Tim Boyle，Centre for International Forestry Research，Canada. 11 – 23.

Zhang AB，Kong XB，Li DM，Liu YQ，2004. DNA fingerprinting evidence for the phylogenetic relationship of eight species and subspecies of *Dendrolimus* (Lepidoptera：Lasiocampidae) in China. *Acta Entomologica Sinica*，47 (2)：236 – 242. [张爱兵，孔祥波，李典谟，刘友樵，2004. 中国松毛虫属八个种和亚种亲缘关系的 DNA 指纹证据. 昆虫学报，47(2)：236 – 242.]

Zhao QS，Wu WB，Lu GP，Yuan X，Li SK，Jiang JC，1992. Hybridization experiments with two species of *Dendrolimus*. *Acta Entomologica Sinica*，35(1)：28 – 32. [赵清山，邬文波，吕国平，袁星，李善奎，蒋家城，1992. 松毛虫的种间杂交遗传实验. 昆虫学报，35 (1)：28 – 32]

Zhao QS，Wu WB，Lu GP，Chen TF，Lin QY，1999. Study on cross heredity of pine caterpiliars，*Dendrolimus* spp. *Scientia Silvae Sinicae*，35(4)：45 – 50. [赵清山，邬文波，吕国平，陈泰峰，林庆源，1999. 松毛虫种间杂交及其遗传规律的研究. 林业科学，35(4)：45 – 50]

(责任编辑：袁德成)